

Quantifizierung von Histokompatibilitätsantigenen auf Rattenlymphozyten mittels Durchflußzytometrie

Ernil Hansen

Max-Planck-Institut für Biochemie, Abteilung Biochemische Arbeitsmethoden
(Prof. Dr. K. Hannig), D-8033 Martinsried, Bundesrepublik Deutschland

Quantitation of Histocompatibility Antigens on Rat Lymphocytes by Flow Cytometry

Summary. For studies on quantitative aspects of MHC-coded surface antigens on rat lymphocytes, cell separation methods were combined with flow cytometry, using direct immunofluorescence and titration to antibody saturation. Lymphocyte subpopulations were isolated from spleen, lymph nodes, thymus and bone marrow of BN rats by $1 \times g$ sedimentation and free-flow electrophoresis. They were incubated with fluorescein conjugated $F(ab')_2$ antibody fragments directed against MHC-antigens. Flow cytometry showed fluorescence intensities clearly separated from background signals, increasing with antibody concentration. Mean fluorescence intensities of the cells were compared at plateau level of antibody uptake and revealed substantial differences in the quantitative expression of these antigens:

- a) B cells bound larger amounts of the antibody than T cells.
- b) B cells from spleen and lymph nodes differed in antibody uptake.
- c) In the T lineage medullary thymocytes showed higher antigen expression than cortical thymocytes, but still lower than mature T cells.
- d) The dominant, Thy-1 antigen carrying lymphocyte population of bone marrow showed a density of MHC-antigens between that of thymocytes and mature peripheral lymphocytes.

Calibration with particles of known FITC content led to an estimation on the total amount of histocompatibility antigens expressed on lymphocytes, which seems to be a characteristic feature of certain stages in function, maturation and activation.

Key words: Lymphocytes – Preparative cell electrophoresis – Histocompatibility antigens – Flow cytometry

In zunehmendem Maße zeichnet sich die Bedeutung von Oberflächenantigenen, die im Haupthistokompatibilitäts-Genkomplex (MHC) kodiert sind, für die Funktion und Regulation von Lymphozyten ab [7]. So wird durch sie die Spezifität zytotoxischer T-Lymphozyten kontrolliert, ebenso wie die Kooperation zwischen T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen während der Immunantwort.

Unklar ist, welche Rolle die Menge an MHC-Antigenen auf den Lymphozyten bei diesen Vorgängen spielt. Änderungen in der Expression dieser Antigene während der Differenzierung und während des Zellzyklus oder nach Induktion durch Mitogene, Virusinfektion oder bei neoplastischer Transformation wurden beobachtet und deuten auf eine Relevanz der Antigenquantität hin [1]. Es wurde nun hier die Frage untersucht, inwiefern sich verschiedene Lymphozytenpopulationen der Ratte hinsichtlich der Menge an Histokompatibilitätsantigenen unterscheiden.

Gebräuchliche Methoden der Quantifizierung von Oberflächenantigenen, wie Absorptionsstudien und Radioimmunteste, messen die durchschnittliche Antikörperbindungskapazität der gesamten Zellprobe und finden daher ihre Grenzen an der Heterogenität der untersuchten Zellen. Um die komplexe Zusammensetzung der Lymphozyten aufzulösen, wurden in der vorliegenden Arbeit Zelltrennmethoden und Durchflußzytometrie eingesetzt.

Gerade die trägerfreie Zellelektrophorese hat sich für die Auftrennung von Lymphozyten verschiedener Funktion und verschiedener Reifungsstufe bewährt [15, 16]. Sie arbeitet „trägerfrei“, so daß Veränderungen der Antigenverteilung, ausgelöst durch Wechselwirkung der Zellen mit festen Oberflächen oder Partikeln, vermieden werden. Die Durchflußzytometrie erlaubt die Messung der Fluoreszenzintensität auf Einzelzellen in schneller Folge und so die Bestimmung der an die Zelle gebundenen markierten Antikörper. Unter bestimmten Bedingungen, wie die hier durchgeführte Verwendung von Antikörperfragmenten, direkter Antikörpermarkierung und Titration bis zur Antikörpersättigung, ist damit eine Quantifizierung von Oberflächenantigenen möglich.

Material und Methoden

Tiere und Zellen

Verwendet wurden 8 Wochen alte, männliche BN-Inzuchtratten, die ursprünglich vom MPI für Immunbiologie, Freiburg/Br., bezogen und später selbst weitergezüchtet wurden. Aus Milz, Lymphknoten und Thymus wurden Einzelzellsuspensionen durch Zerzupfen mit einer Kanüle hergestellt, aus Knochenmark durch Herausspülen aus Ober- und Unterschenkelknochen und leichtem Pipettieren. Die Zellen wurden zweimal in Kulturmedium Puck-G (Difco, Detroit, USA) gewaschen und durch wattagestopfte Pasteurpipetten filtriert.

Zelltrennungen

Knochenmarkslymphozyten wurden wie beschrieben durch $1 \times g$ -Sedimentation angereichert [16]. Nach 6 h Sedimentation in einem Gradienten von 0,3–1,2% Rinderserumalbumin (Armour Pharm. Comp., Phoenix, USA) in Puck-G wurden Zellen mit einer Sedimentationsgeschwindigkeit von 2,7–3,5 mm/h vereinigt, die zu über 90% Lymphozyten darstellten.

Lymphozyten der verschiedenen Organe wurden durch trägerfreie Zellelektrophorese in einer Apparatur vom Typ Elpho VAP FF5 (Bender u. Hobein, München, BRD) unter Standardbedingungen getrennt [15, 16].

Antiseren

Xenoantisera aus Kaninchen gegen Ratten-Ig, Thy-1-Antigen, sowie gegen die T-Zell-spezifischen Antigene RTLA und RHLA, wurden hergestellt und die jeweilige Ig-Fraktion mit FITC gekoppelt [15]. Mit ihnen wurde in direkter Immunfluoreszenz der Prozentsatz an antigenpositiven Lymphozyten in den isolierten Zellproben bestimmt.

Ein Alloantiserum gegen Lymphozyten von BN-Ratten wurden aus 3 Monate alten, weiblichen Wistar-Inzuchtratten (Gesellschaft für Strahlenforschung und Umweltschutz, Neuherberg, BRD) durch wöchentliche s.c.-Injektionen von Milz- und Lymphknotenzellen aus weiblichen BN-Ratten erhalten. Seren mit einem Lymphozytotoxintiter von mindestens $1/128$ wurden vereinigt und IgG durch Gelchromatographie über Sephacryl S200 (Pharmacia, Uppsala, Schweden) gewonnen.

Zur Abschätzung der Spezifität wurde mit diesem Alloantiserum eine Immunpräzipitation ^{125}I -markierter, mit Detergens Nonidet P40 extrahierter Membranproteine aus Lymphknotenzellen durchgeführt. Die Antigen-Antikörper-Komplexe wurden mittels Protein-A-Sepharose (Pharmacia, Uppsala, Schweden) isoliert und in SDS gelöst, dann auf 7,5% SDS-PAGE getrennt und autoradiographisch nachgewiesen [6].

Aus dem Immunglobulin wurden F(ab')_2 -Fragmente präpariert, diese mit FITC gekoppelt und markierte Antikörper mit einem molaren Fluoreszein/Protein-Verhältnis von etwa vier isoliert [16]. Dieses FITC- F(ab')_2 aus Wistar-anti-BN-Alloantiserum wurde auf eine Proteinkonzentration von 20 mg/ml eingengt und vor Gebrauch 30 min bei $15000 \times g$ zentrifugiert, um Aggregate zu eliminieren.

Durchflußzytometrie

Je 5×10^5 Zellen wurden mit 50 μl verschiedener Verdünnungen des FITC-markierten F(ab')_2 aus Wistar-anti-BN-Immunglobulin bei 4°C im Dunkeln für 50 min inkubiert. Nach dieser Zeit waren 95% der Antikörperbindung einer 5 h-Inkubation erreicht. Die Zellen wurden anschließend in phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und resuspendiert. Die Zellen zeigten unter dem Fluoreszenzmikroskop gleichmäßige, ringförmige Fluoreszenz und kein „Capping“.

Die Fluoreszenzintensität der Zellen wurde durchflußzytometrisch bestimmt mit einem Gerät, das in unserer Abteilung von Dipl.-Phys. L. Voet gebaut wurde und kommerziell erhältlichen Zellsortern entspricht (FACS, Becton-Dickenson, Mountain View). Die Fluoreszenzanregung erfolgte durch einen 5-W-Argon-Laser bei 488 nm mit einer Intensität von 800 mW. Es wurden jeweils etwa 200 000 Zellen bei einer Durchflußrate von 500 Zellen/s untersucht. Vor und nach jeder Meßreihe wurden fluoreszierende Polystyrolpartikel von 1,5 μm Durchmesser (DUKE Scientific Corp., Palo Alto, USA) als Standard gemessen.

Die Meßdaten wurden gespeichert und mit einem Rechner (9820 A, Hewlett-Packard Co., Palo Alto, USA) analysiert. Nach Standardisierung, Umrechnung auf gleiche Verstärkung und Subtraktion der Negativkontrolle (FITC Wistar-anti-BN-Antikörper + Lymphozyten aus Wistar-Ratten) wurde ein Medianwert als „mittlere Fluoreszenzintensität“ für jede Zellprobe ermittelt. Zur Eichung des Zytometers wurden Partikel mit bekanntem FITC-Gehalt gemessen, die freundlicherweise von Dr. G. Valet, Max-Planck-Institut für Biochemie, zur Verfügung gestellt wurden.

Ergebnisse

Die durch trägerfreie Elektrophorese getrennten Lymphozyten wurden im Bereich hoher (H) bzw. niederer (L) elektrophoretischer Beweglichkeit vereinigt (Abb. 1), wobei die Vitalität der Zellen immer über 90% betrug.

Tabelle 1 zeigt die Charakterisierung dieser Zellpopulationen anhand von Oberflächenantigenen, nachgewiesen in direkter Immunfluoreszenz. Danach entsprach der H-Bereich aus Milz und Lymphknoten reifen T-Zellen, gekennzeichnet durch die T-Zell-spezifischen Antigene RTLA. Der L-Bereich bestand im wesentlichen aus B-Lymphozyten.

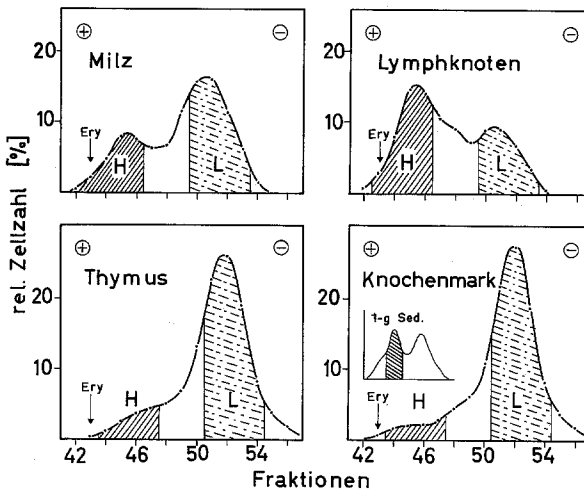


Abb. 1. Verteilung kernhaltiger Zellen in der trägerfreien Elektrophorese. Aus Knochenmark wurden Zellen mit Sedimentationsgeschwindigkeiten von 2,7–3,5 mm/h zur Trennung verwendet. *H* = Bereich hoher, *L* = Bereich niedriger elektrophoretischer Beweglichkeit. „Ery“ zeigt die Position Glutardialdehyd-fixierter Ratten-Erythrozyten an

Tabelle 1. Prozentsatz antigenpositiver Zellen im *H*- und *L*-Bereich der Zellelektrophorese, gemessen in direkter Immunfluoreszenz mit Antisera gegen Ratten-Ig, T-Zell-spezifische Antigene und Thy-1-Antigen

	Milz		Lymphknoten		Thymus		Knochenmark	
	H	L	H	L	H	L	H	L
Ig	3	95	5	96	<1	<1	<1	8
RTLA	92	<1	90	<1	99	98	33	<1
RHLA					61	<1		
Thy-1	<1	9	4	12	92	98	5	91

Die Hauptmenge an Thymozyten wies geringe Oberflächenladungsdichte auf und stellt kortikale Thymozyten dar. Medulläre Thymozyten fanden sich dagegen nur im *H*-Bereich der Zelltrennung. Sie sind charakterisiert durch den Besitz von RHLA, Antigenen, die durch ein mit kortikalen Thymozyten absorbiertes Anti-RTLA Antiserum nachgewiesen wurden [15]. Durch 1 × g Sedimentation angereicherte Knochenmarkslimphozyten zeigten in der Elektrophorese vorwiegend niedere elektrophoretische Beweglichkeit. Im *H*-Bereich fanden sich die wenigen reifen T-Limphozyten und nicht-lymphoide Zellen, während der *L*-Bereich sich aus einigen B-Zellen und ansonsten aus Thy-1-Antigen-positiven, kleinen Limphozyten zusammensetzte. Wie aus Tabelle 1 ersichtlich, wurden sechs Limphozytenpopula-

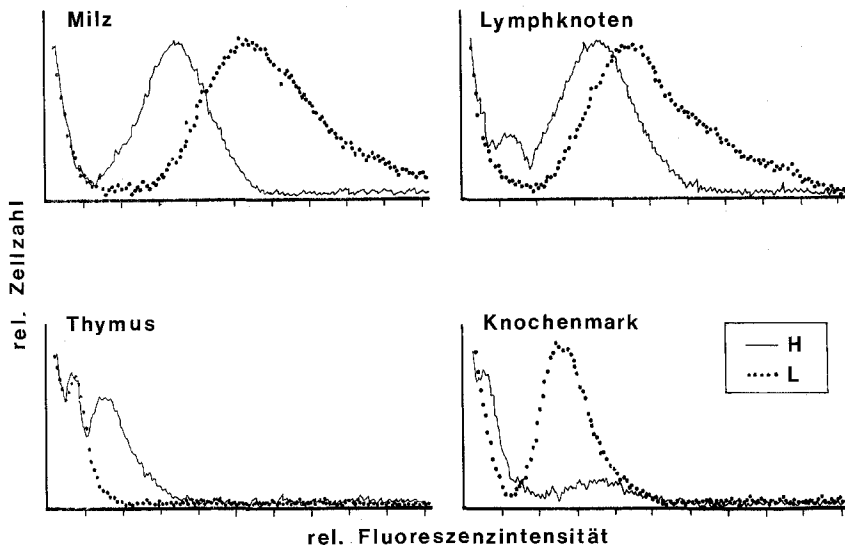


Abb. 2. Fluoreszenzhistogramme von Zellen hoher (H) und niederer (L) elektrophoretischer Beweglichkeit, gemessen im Durchflußzytometer nach Färbung mit einer 1:32-Verdünnung von FITC-F(ab')₂ aus Wistar-Anti-BN-Antiserum

tionen, nämlich B-Zellen aus Milz und Lymphknoten, T-Zellen aus Milz und Lymphknoten, kortikale Thymozyten und Thy-1-Antigen-tragende Knochenmarkslymphozyten in über 90% Reinheit erhalten; medulläre Thymozyten konnten angereichert werden.

In der Durchflußzytometrie zeigten die Zellpopulationen nach Reaktion mit FITC-markierten F(ab')₂-Fragmenten aus Wistar-anti-BN-Antiserum die in Abb. 2 wiedergegebenen Fluoreszenzhistogramme. Hier, wie auch in Abb. 3, sind repräsentative Ergebnisse aus einem von vier Versuchen dargestellt. Während Kontrollzellen aus Wistar-Ratten nur exponentiell abfallende Untergrundsignale lieferten (Ergebnisse nicht gezeigt), waren die Fluoreszenzintensitäten fast aller aus BN-Ratten isolierten Lymphozytenpopulationen deutlich vom „Rauschen“ abgesetzt. Dies erlaubte die Bestimmung einer mittleren Fluoreszenzintensität für jede der Zellarten.

Die untersuchten Proben unterschieden sich auffallend in der Form ihrer Fluoreszenzhistogramme. Während für einige Zellpopulationen die Fluoreszenzintensitäten normalverteilt waren, wiesen andere Histogramme Schiefen auf oder waren bimodal, beides Zeichen einer Heterogenität der Zellprobe. Bimodalitäten wurden in Gaußkurven aufgelöst, für schiefe Verteilungen ein Medianwert ermittelt.

Die einzelnen Lymphozytenpopulationen zeigten deutliche Unterschiede in ihrer mittleren Fluoreszenzintensität. Da ungetrennte Lymphknotenzellen die gleichen Fluoreszenzhistogramme ergaben wie solche nach Wiedervereinigung der Fraktionen aus 1 × g-Sedimentation oder Zellelektrophorese (Ergebnisse nicht gezeigt), sind die an den getrennten Zellen beobachteten Unterschiede als für diese Zellen typisch anzusehen und nicht durch die Zelltrennung zu erklären.

Mit steigender Antikörperkonzentration verschoben sich die gemessenen Profile zu höheren Kanälen hin, es nahm die mittlere Fluoreszenzintensität jeder Lympho-

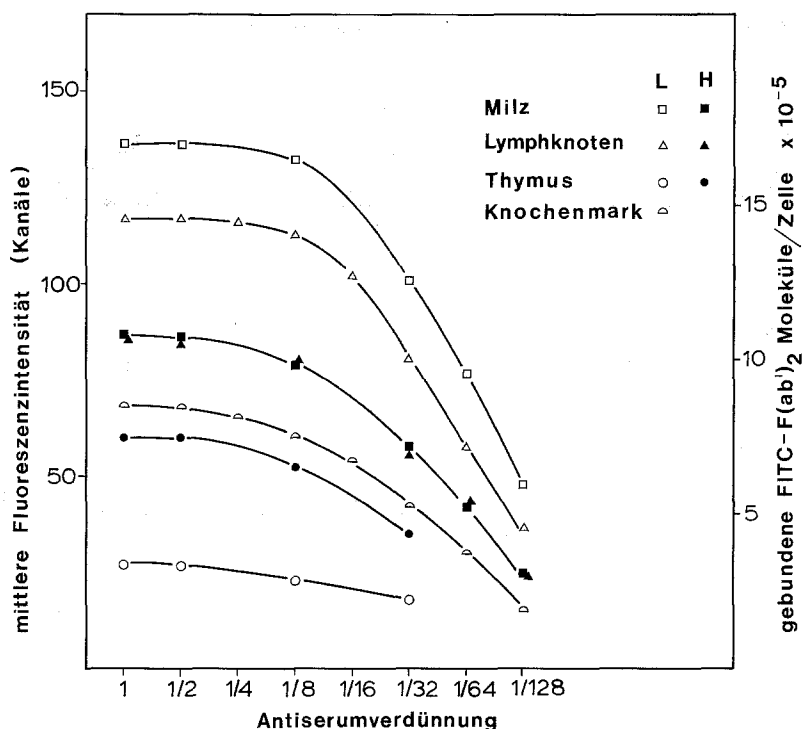


Abb. 3. Mittlere Fluoreszenzintensität von Zellen hoher (*H*) und niederer (*L*) elektrophoretischer Beweglichkeit bei Titration mit FITC-F(ab')₂ aus Wistar-anti-BN-Antiserum

zytenpopulation zu (Abb. 3). Der Variationskoeffizient der Intensitätsverteilung, der für die verschiedenen Zellpopulationen zwischen 23 und 28% lag, blieb dabei unverändert. Dieser Anstieg der Fluoreszenzstärke ging in ein Plateau über, d.h. es wurde eine Antikörpersättigung erreicht. Für jede Lymphozytenpopulation ergab sich ein charakteristischer Wert der maximalen Antikörperaufnahme, der für B-Zellen aus der Milz am höchsten lag, nämlich 4,5fach höher als für kortikale Thymozyten.

Eine Eichung auf gebundene Antikörper pro Zelle erfolgte durch Messung von Partikeln mit bekanntem FITC-Gehalt und Division durch das bekannte Kopplungsverhältnis von 4 Molekülen FITC pro F(ab')₂-Fragment.

Schließlich wurden die Membranproteine analysiert, mit denen das verwendete Antiserum spezifisch reagierte. Aus der Vielzahl von Laktoperoxidase-jodierbaren und durch NP-40 extrahierbaren Membranproteinen aus Lymphknotenzellen von BN-Ratten (A in Abb. 4) wurden durch das hier verwendete Alloantiserum nachweisbar nur 3 präzipitiert (B in Abb. 4). Mit einem relativen Molekulargewicht von 45 000 d entspricht die Hauptkomponente der schweren Kette von MHC-Antigenen der Klasse I (RT1-A), während die zusätzlich gefällten Proteine mit 32 000 d und 28 000 d den Ketten der Ia-ähnlichen Antigene (RT1-B) entsprechen [5, 9, 11].

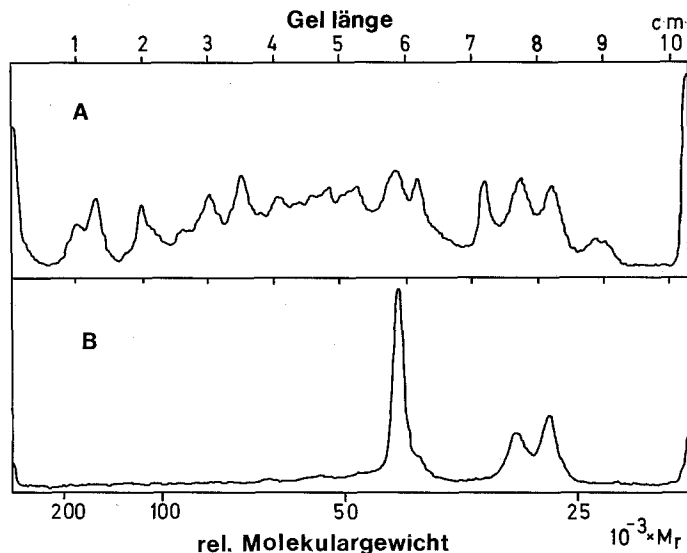


Abb. 4. SDS-PAGE von ^{125}J -markierten Membranproteinen, Densitogramm der Autoradiographien. **A** NP-40-Extrakt aus Lymphknotenzellen von BN-Ratten; **B** Präzipitat des NP-40-Extraktes mit Ig aus Wistar-anti-BN-Alloantiserum; 1,6% der Ausgangsaktivität wurde durch das Antiserum gefällt. Die Präzipitation mit einem Wistar-Normalserum enthielt nur 0,3% der Ausgangsaktivität und zeigte in SDS-PAGE keine Banden

Besprechung

Während sich die wichtige Rolle der MHC-Antigene in der Immunantwort immer deutlicher abzeichnet, ist noch wenig bekannt über die mengenmäßige Ausprägung dieser Antigene auf verschiedenen Lymphozyten und die Bedeutung solcher quantitativer Aspekte. Untersuchungen darüber haben die Heterogenität der Lymphozyten in Bezug auf Funktion, Reifungsstufe und Aktivitätsgrad zum Problem. Durch die Kombination von Zelltrennmethode und Durchflußzytometrie konnten in den hier beschriebenen Versuchen deutliche Unterschiede in der Menge an Histokompatibilitätsantigenen auf der Oberfläche verschiedener Lymphozytenpopulationen der Ratte nachgewiesen und genau bestimmt werden.

Verwendet wurde ein Antiserum mit breiter Spezifität gegen MHC-Antigene. Weder wurde versucht, diese in Transplantationsantigene (RT1-A) und Ia-ähnliche Antigene (RT1-B) oder deren Unterspezifitäten aufzuschlüsseln, noch wurden mit diesem Alloantiserum sicher alle oder sicher nur MHC-Antigene erfaßt. Vielmehr lag daran, eine prinzipielle Methode für die Quantifizierung von Histokompatibilitätsantigenen auf isolierten Lymphozytenpopulationen mittels Durchflußzytometrie zu erarbeiten. Die Analyse der einzelnen polymorphen Determinanten des MHC sollten mit entsprechenden Antisera in gleicher Weise möglich sein.

Die Durchflußzytometrie bietet die Möglichkeit der Fluoreszenzmessung an Einzelzellen in rascher Folge. Gegenüber anderen Meßmethoden an Einzelzellen, wie der quantitativen Autoradiographie und der Mikrofluorometrie, erlaubt sie dadurch

die Analyse einer sehr großen Anzahl von Zellen mit entsprechender Statistik. Eine Quantifizierung von Antigenen ist mit der Durchflußzytometrie nicht per se, sondern nur unter besonderen Voraussetzungen möglich. Die wesentlichen Bedingungen, unter denen hier mittels Durchflußzytometrie eine Quantifizierung von Oberflächenantigenen durchgeführt wurde, waren:

1. die Verwendung vorgetrennter Zellpopulationen,
2. der Einsatz von $F(ab')_2$ -Fragmenten der Antikörper,
3. die Anwendung direkter Immunfluoreszenz und
4. die Titration bis in Antikörpersättigung.

Mit indirekter Immunfluoreszenz und ungespaltenem Immunglobulin sind die gemessenen Fluoreszenzintensitäten wesentlich breiter verteilt. Gerade bei höheren Antikörperkonzentrationen spielt zunehmend unspezifische Bindung über den Fc-Teil eine Rolle und es treten Zellaggregationen auf. Bei Antikörpertitration wird zwar eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität, aber meist kein Plateau beobachtet. Mit der hier verwendeten direkten Markierung mittels $F(ab')_2$ -Fragmenten wurden dagegen diskrete Verteilungen der Fluoreszenzintensitäten erhalten, für die ein repräsentativer Mittelwert bestimmbar war. Dies bildete die Voraussetzung dafür, eine Veränderung der Fluoreszenzintensität mit der Antikörperkonzentration verfolgen und schließlich das Erreichen einer Sättigung nachweisen zu können.

Der beobachtete Plateauwert der mittleren Fluoreszenzintensität – als Maß für die maximal gebundene Menge an Antikörpern auf einer Zelle – erst stellt die Grundlage dar für einen quantitativen Vergleich der Antigenexpression auf verschiedenen Zellen und für eine Abschätzung der Absolutmenge dieser Antigene auf der Zelloberfläche.

Für die hier speziell untersuchten MHC-Antigene auf verschiedenen Lymphozyten, gemessen in Antikörpersättigung, ergaben sich folgende Befunde:

- a) B-Zellen banden deutlich mehr Antikörper als T-Zellen. Dieser Unterschied ist nicht allein durch den Besitz der B-Zellen an Ia-Antigenen erklärbar, da er auch mit MHC-Antisera ohne Aktivität gegen Ia-Antigene zu beobachten ist (Manuskript in Vorbereitung) und ist damit in Übereinstimmung mit der Beschreibung unterschiedlichen HLA-Gehaltes auf humanen T- und B-Lymphozyten [14]. Dagegen schlossen Howard und Mitarbeiter aus Untersuchungen an Ductuslymphzellen aus normalen und thymektomierten Ratten auf eine gleichhohe Expression von RT1-A-Antigenen auf T- und B-Lymphozyten [5].
- b) B-Zellen aus Milz und Lymphknoten zeigten ungleiche Mengen an MHC-Antigenen, während unter den T-Zellen kein Unterschied beobachtet wurde. Eine derartige Heterogenität in der B-Zellreihe ist bisher nur für Ia-Antigene auf Maus-Lymphozyten bekannt [10]. Eigene weitere Untersuchungen weisen darauf hin, daß die hier aufgezeigten Unterschiede sich ebenfalls auf RT1-A-Antigene erstrecken. Das Ergebnis könnte Ausdruck einer unterschiedlichen Zusammensetzung von Milz und Lymphknoten aus B-Zellpopulationen verschiedener Reifungsstufe oder Aktivierungsgrades sein. Hart und Mitarbeiter beobachteten demgegenüber in Absorptionsstudien an DA- und Lewis-Ratten keine Unterschiede zwischen Lymphozyten aus Milz und Lymphknoten, weder im Gehalt an RT1-A- noch an RT1-B-Antigenen [4].
- c) Die Menge an MHC-Antigenen nahm in der Reihenfolge kortikale Thymozyten-medulläre Thymozyten-periphere T-Zellen zu. Dies entspricht den für die Maus beschriebenen Verhältnissen [2,8]. Doch scheint in der Ratte der Unterschied zwischen

kortikalen Thymozyten und peripheren T-Zellen weniger, der zwischen medullären Thymozyten und reifen T-Zellen stärker ausgeprägt zu sein.

d) Thy-1-Antigen-tragende Lymphozyten aus Rattenknochenmark lagen in ihrer Dichte an MHC-Antigenen zwischen der von Thymozyten und peripheren, reifen Lymphozyten. Diese unreifen lymphoiden Zellen repräsentieren etwa 30% des Knochenmarks, besitzen kein Oberflächen-Ig und sind thymusunabhängig [3]. Da Ia-Antigene auf weniger als 5% der Rattenknochenmarkszellen gefunden werden [9], spiegeln die hier erhaltenen Werte den Gehalt dieser dominierenden Lymphozytenpopulation des Knochenmarks an MHC-Antigenen der Klasse I (RT1-A) wider. Über diese Lymphozyten, deren Zugehörigkeit und Bedeutung weiterhin unklar ist, lagen bisher keine quantitativen Angaben über ihre Expression an Histokompatibilitätsantigenen vor.

Der Fluoreszenzwert bei Antikörpersättigung erlaubte des weiteren – nach Eichung des Durchflußzytometers mit Partikeln bekannten FITC-Gehaltes und bei bekanntem FITC-Kopplungsgrad der Antikörper – eine Abschätzung der Absolutmenge an MHC-Antigenen auf verschiedenen Lymphozyten. Dabei kann nach mehreren Autoren für die zellgebundenen Antigene und Antikörper ein Verhältnis von etwa 1:1 zugrundegelegt werden [3, 14]. Unter dieser Annahme ergab sich z. B. für T-Lymphozyten eine Anzahl von etwa $1,1 \times 10^6$ MHC-Antigenmolekülen pro Zelle (Abb. 3). Dieser Wert liegt in der gleichen Größenordnung wie der für Human-T-Zellen mit $0,15 \times 10^6$ [14], für Maus-Milzzellen oder -Lymphknotenzellen mit $1,4 \times 10^6$ [12] bzw. $0,6 \times 10^6$ [2] und für Ratten-Ductuslymphzellen mit $0,3 \times 10^6$ [5] bestimmten. Ein Vergleich ist jedoch durch die unterschiedliche Spezifität der verwendeten Antikörper und die genetisch bedingten Unterschiede der MHC-Antigenexpression [5, 12] nur eingeschränkt möglich.

Neben dem Sättigungswert ist auch die Antikörperkonzentration, bei der Halbsättigung erreicht wird, von Interesse. Sie ist ein Maß für die Antikörper-Antigen-Bindungsstärke. Im Falle der MHC-Antigene lag dieser Wert für alle Lymphozytenpopulationen etwa bei Verdünnung 1:80 (Abb. 3). Für das Thy-1-Antigen dagegen wird die Halbsättigung auf Thymozyten und Knochenmarkslymphozyten bei verschiedenen Antikörperverdünnungen erreicht, was dann für eine unterschiedliche Zugänglichkeit dieses Antigens auf den verschiedenen Zellen spricht [3].

Auch die Form der Fluoreszenzhistogramme war charakteristisch für jede Zellprobe (Abb. 2). So fiel die Homogenität der Knochenmarkslymphozyten in Bezug auf ihren MHC-Antigengehalt auf. In dieser Zellpopulation sollen sowohl T- als auch B-Vorläuferzellen enthalten sein [13]. Der kleine Gipfel im Histogramm der Lymphknotenzellen hoher elektrophoretischer Beweglichkeit könnte den Thy-1-positiven, thymusabhängigen Lymphozyten entsprechen, die in dieser Zellprobe nachweisbar sind [3]. Eine ausgeprägte Heterogenität zeigten die Fluoreszenzintensitätsverteilungen der B-Zellen auf. Hier sollen Versuche in der beschriebenen Weise mit weiter aufgetrennten Zellpopulationen und mit Antikörpern engerer Spezifität weitere Aufklärung bringen.

Frau R. Wiemeyer, Frau C. Eckelt und Frau R. Güthling danke ich für ausgezeichnete Assistenz.

Literatur

1. Ferrone S, Pellegrino MA, Reisfeld RA (1974) A biological and chemical profile of histocompatibility antigens. In: Sela M (ed) *The antigens*, vol III, chapt 6. Academic Press, New York London, p 361
2. Hämmerling U, Eggers HJ (1970) Quantitative measurement of uptake of alloantibody on mouse lymphocytes. *Eur J Biochem* 17: 95
3. Hansen E (1979) Zweidimensionale Trennung von Knochenmarkslymphozyten der Ratte und ihre Charakterisierung durch physikalische Parameter und Differenzierungsantigene. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München
4. Hart DNJ, Fabre JW (1979) Quantitative studies on the tissue distribution of Ia and SD antigens in the DA and Lewis rat strains. *Transplantation* 27: 110
5. Howard JC, Butcher GW, Galfre G, Milstein C, Milstein CP (1979) Monoclonal antibodies as tools to analyze the serological and genetic complexities of major transplantation antigens. *Immunol Rev* 47: 139
6. Jilg W, Hannig K (1981) Lymphocyte surface proteins recognized by an anti-thymocyte globulin. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 362: 1475
7. Klein J (1977) Evolution and function of the major histocompatibility system: facts and speculations. In: Götze D (ed) *The major histocompatibility system in man and animals*. Springer, Berlin New York, p 339
8. Konda S, Stockert E, Smith RT (1973) Immunological properties of mouse thymus cells: membrane antigen patterns. *Cell Immunol* 7: 275
9. McMaster WR, Williams AF (1979) Monoclonal antibodies to Ia antigens from rat thymus: cross reactions with mouse and human and use in purification of rat Ia glycoproteins. *Immunol Rev* 47: 117
10. Mond JJ, Kessler S, Finkelman FD, Paul WE, Scher I (1980) Heterogeneity of Ia expression on normal B cells, neonatal B cells, and on cells from B cell-defective CBA/N mice. *J Immunol* 124: 1675
11. Nilsson SF, Wigzell H (1978) Isolation and partial characterization of rat lymphoid cell surface histocompatibility antigens and immunoglobulins. *Scand J Immunol* 7: 307
12. O'Neill HC, McKenzie IFC (1980) Quantitative variation in H-2-antigen expression: I. Estimation of H-2K and H-2D expression in different strains of mice. *Immunogenetics* 11: 225
13. Ritter MA, Gordon LK, Goldschneider I (1978) Distribution and identity of Thy-1-bearing cells during ontogeny in rat hemopoietic and lymphoid tissues. *J Immunol* 121: 2463
14. Trucco M, de Petris S, Garotta G, Ceppellini R (1980) Quantitative analysis of cell surface HLA structures by means of monoclonal antibodies. *Human Immunol* 3: 233
15. Zeiller K, Pascher G (1978) Differentiation antigens in rat lymphocyte subpopulations recognized by rabbit antisera against electrophoretically separated cells. *Eur J Immunol* 8: 469
16. Zeiller K, Hansen E (1979) Characterization of rat bone marrow cells. II. Analysis of surface antigens in small lymphocytes with particular reference to thymus antigen-carrying cells. *Cell Immunol* 44: 381

Eingegangen am 10. Juli 1981/Angenommen am 11. Oktober 1981